

Arh. hig. rada, 21 (1970) 373

LJEVAČKA GROZNICA, CINK I SERUMSKE BJELANČEVINE

L. ŠTILINOVIĆ, G. GRUBIŠIĆ

*Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada Jugoslavenske akademije
znanosti i umjetnosti, Zagreb*

(Primljeno 15. XII 1970)

Iscrpno je opisano biološko značenje cinka. Osobita pažnja poklonjena je istraživanjima fizikalno-kemijskog stanja cinka i interakciji cinka sa serumskim proteinima. Detaljno je opisana ljevačka odnosno cinkova groznica u svjetlu novijih eksperimentalnih radova i hipoteza o mehanizmu njezinog nastajanja.

Poznato je da ljevačka groznica, nazvana još i cinkova groznica, po svojim manifestacijama jako nalichi na stanje koje se može izazvati parenteralnim davanjem stranih bjelančevina. S druge strane je poznato da se neki metali vežu sa stanovitim serumskim proteinima koji se normalno nalaze u krvi i služe kao fiziološki prenosioci metala npr. transferin je beta₁-globulin sa željezom. Neki metali pak sa stanovitim bjelančevinama tvore i takozvanu abnormalnu komponentu seruma, npr. kadmij stvara čak i patološku proteinuriju.

Uzmemo li u obzir te činjenice možemo reći da su simptomi cinkove groznice posljedica prisustva strane bjelančevine u tijelu, naime udahnuti cink se vjerojatno vezao na neku u krvi normalno prisutnu bjelančevinu, a ona se zbog te veze toliko izmijenila da je postala strana tijelu. Zbog prisutnosti te strane bjelančevine mogli bi očekivati da je u serumu ispitanika koji su bili izloženi parama cinka drugačija distribucija in vitro vezanog ⁶⁵Zn na elektroforski separiranim serumskim bjelančevinama, nego u serumu ispitanika koji nisu bili izloženi parama cinka.

Očita kontradikcija u objavljenoj literaturi navela je još *Okunewicka* i sur. (1) da ponovno ispituju distribuciju cinka u plazmi. U vrlo pomno izvedenim pokusima koristeći ultracentrifugu i jednodimenzionalnu elektrofrezu autori su došli do zaključka da je cink distribuiran u skoro paralelnom omjeru s relativnim postotkom prisutnih bjelančevina. Te rezultate oni dovode u vezu s ranije objavljenim rezultatima *Vikbladha*

(2, 3), *Wolffa* (4-8), *Gurda* (9) i *Guna* (10). U suprotnosti s tim rezultatima *Uesell* i *Bearn* (11) a kasnije *Dennes* i sur. (12) su opisali da je preferirana lokalizacija ^{65}Zn u alfa globulinskoj regiji. Ispitivanje su izvršili jednodimenzionalnom elektroforezom kod pH 8,6 in vitro obilježene plazme sa ^{65}Zn .

Prema postojećoj literaturi nema značajnih razlika u distribuciji ^{65}Zn bez obzira da li se obilježavanje vrši in vivo ili in vitro i da li se za ispitivanje uzme plazma ili serum. Ovo je bio razlog zbog kojeg smo se mi odlučili na in vitro obilježavanje seruma sa ^{65}Zn ; dio rezultata tog rada već je objavljen (13, 14).

Zbog već spomenutih razlika u rezultatima raznih autora, morali smo obratiti osobitu pažnju s obzirom na moguće pogreške koje se mogu dogoditi kod upotrebe raznih elektroforetskih tehnika, koje služe za separaciju bjelančevina.

U ovom prikazu iznijet ćemo literaturne podatke općenito o biološkom značenju cinka, a zatim ćemo u posebnom dijelu opisati rezultate onih autora koji su ispitivali distribuciju ^{65}Zn u serumu ili plazmi. Osim toga, posebno ćemo se osvrnuti na problem takozvane ljevačke groznice ili cinkove groznice, patogeneza koje ni do danas još nije potpuno razjašnjena.

Općenito o biološkom značenju cinka

Mikroelementi ili oligoelementi nalaze se u organizmu u koncentraciji ispod 0,01% tjelesne težine (15). Među te elemente ubrajamo željezo, bakar, mangan, nikal, kobalt, molibden, cink i neke druge.

Još je 1869. godine *Raulin* (16) upozorio na neophodnost cinka za rast gljivice *Aspergillus niger*. Nedostatak cinka dovodi do različitih patoloških stanja kod nižih i viših biljaka. Kod plijesni *Neurospora crassa* nedostatak cinka dovodi do gubitka enzimatske aktivnosti heksokinaze. Taj isti fenomen je primijećen i kod rajčice (16).

Rasprostranjenost cinka u živim organizmima ispitivao je *Lutz* (17). On je našao da je cink prisutan u svim organima miševa, mačaka i ljudi. U radovima *Shelina* i sur. (18, 19) promatran je metabolizam cinka kod miševa i pasa. Naiaktivniji promet cinka je nađen u jetri, bubrezima i pankreasu. Najnižu aktivnost su primijetili u mozgu, skeletnim mišićima i koži, dok je aktivnost slezene, gastrointestinalnog trakta, pluća, limfnih čvorova, kosti, srca i timusa bila osrednja. Našli su da cink prolazi i kroz placentu.

Prasad i sur. (20) navode da zbog nedostatka cinka kod miševa i štakora nastaju defekti u rastu, smanjena težina i hipotrofija seksualnih organa s hipofunkcijom. Kod domaćih životinja kronični manjak cinka uzrokuje subnormalan rast i parakeratozna oštećenja kože, dermatitis i atrofiju seminifernih tubula (21). Deficit cinka kod životinja produžuje apsorpciju glukoze iz gastrointestinalnog trakta, smanjuje aktivnost crijevne fosfataze dok se aktivnost fosfataze kostiju ne mijenja, a smanjuje proteolitičku aktivnost pepsina i tripsina, kao i aktivnost pankreatične amilaze (22).

Slične smetnje zbog nedostatka cinka opisane su i kod ljudi (23). Nedostatak cinka može biti uzrokovan prehranom bez životinjskih proteina, zbog gubitka krvi, kao i gubitka cinka znojenjem npr. u tropskoj klimi. Tijelo odrasla čovjeka sadrži približno 2 g cinka. Teško je uspoređivati rezultate za pojedine organe, jer se navedene vrijednosti jedamput odnose na svježe staničje, a drugi put na opepeljeno tkivo. Organi čovjeka i drugih kralježnjaka sadrže 10–200 μg cinka po gramu opepeljenog tkiva, a jetra i kosti 60–180 μg po gramu svježeg staničja, dok normalna prostata oko 900 μg po gramu suhe tvari. Osobito se ističe visoki sadržaj cinka u retini 500 μg a i 1000 μg ili čak 5000 μg po gramu svježeg staničja u irisu riba i sisavaca (21).

Kad su *Keillin* i *Mann* 1940. godine (24) ustanovili da je cink sastojak enzima karboanhidraze naglo je porastao interes za proučavanje tog metala u biološkim sistemima.

Vallee (21) navodi ove enzime kao cink-metalo enzime: karboksipeptidaze goveđeg pankreasa, karboanhidraza goveđih eritrocita, alkoholdehidrogenaza iz kvasca, alkoholdehidrogenaza iz jetre, glutamindehidrogenaza goveđe jetre, mliječna dehidrogenaza mišićja kunića, alkalna fosfataza bubrega svinje. U najnovijoj literaturi (25) spominje se oko dvadeset enzima koji sadrže cink ili im je cink neophodan za enzimsku aktivnost.

Cink-metaloenzimi sadrže cinkove atome vezane na proteine. Agensi koji vezuju cink inhibiraju enzimatsku aktivnost što dokazuje da je prisutnost cinka esencijalna za aktivnost enzima.

Karboanhidraza izolirana iz eritrocita čovjeka sadrži cinka u sastavu molekule, a katalizira reakciju $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3$. Prisutnost cinka je esencijalna za tu reakciju. Cink se nalazi i u gastrointestinalnoj sluznici i epitelu mnogih žlijezda u organizmu (21). U dehidrogenazi mliječne kiseline cink igra važnu ulogu kod pretvaranja pirogrogždane kiseline u mliječnu i obratno. Cink se vrlo lako veže s inzulinom, ali nije esencijalan za njegovo djelovanje. On se resorbira u tankom crijevu i u plazmi se nalazi vezan na bjelančevinc, a od toga je trećina vezana stabilno, a dvije trećine labilno (21, 22).

Fizikalno kemijska ispitivanja su pokazala da je cink u plazmi vjerojatno vezan na aminokiseline, peptide i proteine (26). Koncentracija cinka u krvi varira od 700–800 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, od toga se u plazmi nalazi 22%, u eritrocitima 75% a u leukocitima 3%. Analize pokazuju da su ekvivalentne količine cinka u serumu i plazmi, a to znači da cink i njegovo kretanje nije vazno za grušanje krvi (21).

Wolff (5) je odredio cink u serumu 100 zdravih ispitanika i našao da se vrijednosti kreću između 150 i 250 $\mu\text{g}/\%$ cinka. Kasnije je isti autor (6) našao nešto niže vrijednosti 100–160 $\mu\text{g}/\%$ cinka u serumu. Nisu zapažene dnevne ili sezonske varijacije cinka u serumu, niti razlike s obzirom na spol i dob, a ni značajne varijacije u trudnoći.

Normalne vrijednosti serumskog cinka po različitim autorima iznesene su u tablici I.

Tablica 1.

Normalne vrijednosti cinka u serumu

Količina	Autor	Godina	Broj u literaturi
124 ± 16 $\mu\text{g}^0/\text{o}$	Vikbladh	1950	(2)
100 — 160 $\mu\text{g}^0/\text{o}$	Wolff	1950	(5)
102 ± 13 $\mu\text{g}^0/\text{o}$	Prasad	1963	(20)
60 — 148 $\mu\text{g}^0/\text{o}$	Olson	1968	(27)
44 — 100 $\mu\text{g}^0/\text{o}$	Stojanovski-Bubanj	1968	(28)

Iz tablice se vidi da su noviji podaci niži i vjerojatno realniji zbog usavršavanja metodike i eliminacije kontaminiranja.

U pojedinim patološkim slučajevima dolazi do odstupanja vrijednosti serumskog cinka od normale. Pad serumskog cinka je nađen u anemijama, akutnom hepatitisu i cirozi jetre (22), dok je porast koncentracije cinka nađen u hipertireozii, poliglobuliji i eozinofiliji (6). *Kahn* i sur. (29) objašnjavaju ovo sniženje serumskog cinka kao posljedicu sniženja koncentracije proteina koji vežu cink, a povišene vrijednosti su rezultat oslobađanja cinka iz encima u oštećenim jetrenim stanicama ili povišenjem koncentracije proteina koji vežu cink.

Čovjek normalno treba uzimati u hrani 10–15 mg cinka na dan (22).

Urinom izlučeni cink varira prema količini primljenog cinka, a ovisi i o volumenu urina. Prema *Vallee* (21) normalna vrijednost izlučenog cinka u urinu iznosi $440 \pm 120 \mu\text{g}/24$ sata.

Kod cirotičara i bolesnika s hepatitisom izlučivanje cinka je povišeno, a može se pripisati oštećenju stanica jetre, pa je serumska koncentracija snižena, a urinska koncentracija povišena.

Prasad i sur. (20) su ispitali nestajanje cinka iz plazme mjerenjem koncentracije ^{65}Zn u plazmi praćenjem izlučivanja u urinu i fecesu. Plazmatski ^{65}Zn nestaje iza dvanaest sati. *Vallee* (21) navodi da se glavni dio cinka primljen hranom izlučuje stolicom i to 5,1 do 10,3 mg na dan već prema primitku.

Spencer i sur. (30) 1965. godine su pratili ekskreciju i retenciju ^{65}Zn . Bolesnicima oboljelim od raka intravenozno je dana doza od $100 \mu\text{C}$ ^{65}Zn . Oni su našli da koncentracija ^{65}Zn u plazmi brzo opada, dok koncentracija u krvi ostane visoka. Nakon 24 sata odnos koncentracije ^{65}Zn u krvi i plazmi iznosi 3 : 1, a dalje koncentracija u krvi postupno raste četiri tjedna. Glavni put izlučivanja ^{65}Zn je intestinalnim traktom. Jetra, slezena i bubrezi najjače apsorbiraju ^{65}Zn , a vremenom u njima koncentracija ^{65}Zn opada. Žlijezde, uključujući tu pankreas i prostatu, apsorbiraju relativno mnogo ^{65}Zn , ali ipak manje od jetre i bubrega. U tan-

kom i debelom crijevu je također bila relativno visoka koncentracija ^{65}Zn . *Halsted* i *Smith* su u najnovijem radu (25) mjerili koncentraciju cinka u plazmi kod zdravih odraslih ispitanika, kod zdrave djece, kod bolesnika s različitim bolestima, kod trudnica i kod žena koje su peroralno uzimale kontraceptivna sredstva. Koncentraciju cinka u plazmi mjerili su metodom atomske apsorpcije. Srednja vrijednost koncentracije cinka u plazmi za zdrave ispitanike iznosila je $96 \pm 12 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ plazme, za zdravu djecu $89 \pm 13 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ plazme. Koncentracija cinka u plazmi bila je konstantna bez signifikantne varijacije s obzirom na spol, uzimanje hrane ili varijacije diureze.

Abnormalno niske vrijednosti nađene su kod bolesnika s alkoholnom cirozom, kod drugih tipova bolesti jetre, kod aktivne tuberkuloze, kod zapuštenih ulcera, uremije, prije i poslije jednokratne hemodijalize, miokardijalnog infarkta, netuberkulozne plućne infekcije, Downovog sindroma, cistične fibroze s retardacijom rasta, kod patuljastih iranskih seljaka, u trudnica, i kod žena koje su peroralno uzimale kontraceptivna sredstva. Kod cistične fibroze bez retardacije u rastu i kod inaktivne tuberkuloze, nije bilo signifikantnog pada. U tom istraživanju autori (25) nisu našli ni jedno stanje kod kojeg bi ispitanici imali povišenu koncentraciju cinka u plazmi.

Kod nas su *Kallai* i sur. (31) objavili vrijednosti cinka u serumu kod 83 bolesnika s različitim bolestima jetre (10 s opstruktivnom žuticom, 33 s akutnim virusnim hepatitisom i 40 s cirozom jetre). Kod 10 bolesnika s opstruktivnom žuticom bile su normalne vrijednosti cinka u serumu. Normalne vrijednosti su bile i kod 28 od 33 bolesnika s akutnim virusnim hepatitisom. Srednja vrijednost za cink u serumu kod te grupe bolesnika iznosila je $73,15 \mu\text{g}/\%$, sa standardnom devijacijom $\pm 24,75 \mu\text{g}/\%$; nije bilo signifikantne devijacije vrijednosti cinka u serumu tih rezultata od onih iz normalne grupe ($P < 0,10$). Kod 40 bolesnika s cirozom jetre koncentracija cinka u serumu iznosila je od 17,7 do $77,2 \mu\text{g}/\%$, sa srednjom vrijednosti od $47,0 \mu\text{g}/\%$ i standardnom devijacijom $\pm 14,93 \mu\text{g}/\%$ cinka. Statistička obrada vrijednosti cinka u serumu bolesnika s cirozom pokazala je statistički signifikantan pad u odnosu prema normalnoj grupi ($P < 0,01$). Upravo izašla publikacija *Kallaia* i sur. (32) odnosi se na određivanje cinka u urinu i serumu bolesnika s alkoholnom dekompenziranom cirozom jetre. Ispitano je 46 bolesnika i 30 normalnih osoba. Izlučivanje cinka bilo je određeno u 24-satnoj količini urina kod 48 bolesnika i kod 32 normalne osobe. Statistička obrada rezultata bolesnika s cirozom jetre u usporedbi s kontrolnom grupom, pokazala je signifikantan pad cinka u serumu ($P < 0,01$), i istovremeno jedan porast izlučivanja cinka u mokraći bolesnika s cirozom jetre ($P < 0,05$). *Kallai* i sur. (32) upozoravaju da se smanjena koncentracija cinka u serumu našla i kod drugih bolesti jetre, pa prema tome određivanje cinka kod bolesnika s alkoholnom cirozom jetre ima ograničenu vrijednost za diferencijalnu dijagnozu unutar ostalih testova funkcije jetre. S druge strane, dijagnostička vrijednost određivanja cinka u mokraći, koja je u vrlo

širokoj oscilaciji, sasvim je nesignifikantna. Vrijednosti cinka u mokraći mogu dati informaciju o poremećenom metabolizmu cinka kod tih bolesti jetre samo zajedno s rezultatima cinka u serumu.

Cink i serumski proteini

Problemom fizikalno-kemijskog stanja cinka u plazmi, problemom njegovog vezanja na proteine i konačno problemom njegovog transporta u plazmi bavilo se mnogo autora (1-12, 19-38, 45-46), ali ipak ti problemi nisu ni izdaleka dovoljno istraženi.

Gurd i *Goodman* (9) su još 1952. g. ispitivali interakciju cinka s humanim serum albuminom. Ispitivanja su vršili s nepuferiranom otopinom proteina u 0,15 M natrijevom nitratu varirajući količine natrijevog hidroksida i cink klorida. Te otopine su podvrgli ravnotežnoj dijalizi na 0° C, a nakon 48 i 72 sata su određivali cink unutar i izvan vrećice za dijalizu. Prema njihovoj interpretaciji cink se veže na imidazolne grupe histidina u albuminu i to u proporciji od jednog cink iona na jednu imidazolnu grupu.

Vallee (21) je 1959. godine referirao da je nepoznata egzaktna karakteristika, broj i funkcija cink proteina. Taj autor s grupom istraživača još i danas intenzivno radi na otkrivanju cink proteina. Tako su *Himmelhoch* i sur. (33) ispitali dijalizirani humani serum. Separaciju su vršili na kromatografskoj koloni DEAE celuloze u gradijentu koncentracije od 0,005 M do 0,3 M jantarne kiseline i uz gradijent koncentracije 0,04 M do 0,3 M Trisa. Na osnovi koncentracije proteina dobilo se više frakcija, koje su označene slovima od A do H. Te frakcije su bile liofilizirane i kvantitativno prenešene u platinske lončice za spaljivanje. Spaljivanje je trajalo 24 sata na 450° C. Pepeo je otopljen u dvije kapi dušične kiseline i ponovno spaljivan na 500° C dva sata. Tako je dobiven bijeli lako topivi pepeo. Spektrografska mjerenja i svi ostali postupci su bili provedeni uz kontrolu zbog moguće kontaminacije, a napravljen je i slijepi pokus cijelog sistema radi kontrole purifikacije kemikalija. Koncentracija metala je određena atomskom apsorpcijom i emisionom spektroskopijom.

Za cink je nadeno da se nalazi u tri frakcije - D₁, D₂ i F. Te frakcije su ispitane na enzimatsku aktivnost onih enzima za koje se znalo da sadrže cink. Budući da niti jedna frakcija nije pokazala enzimatsku aktivnost dehidrogenaze mliječne kiseline, alkalne fosfataze, karboksi peptidaze ili dehidrogenaze glutaminske kiseline, autori pretpostavljaju da se radi o do sada nepoznatim cinkproteinima.

Tek nedavno su *Parisi* i *Vallee* (34) objavili da su uspjeli izolirati iz humanog seruma alfa₂-makroglobulin koji sadrži cink. Makroglobulin(I) je separiran od manjih plazma proteina(II) gel filtracijom na zrcima agaroze. Cink je određen u obadvije frakcije. Jedan cink-alfa₂-makroglobulin je separiran iz (I) i identificiran imunoelektroforezom. Cink u

(II) asociran je uglavnom s albuminom i nije dalje ispitan. Nekoliko jako pročišćenih uzoraka tog alfa₂-makroglobulina iz humanog seruma ili plazme sadržavali su od 400–700 μg cinka na gram proteina. To je prvi cink metalo-protein koji je pročišćen i identificiran iz humanog seruma. Treba još ispitati njegove funkcije i eventualne promjene u patološkim stanjima.

Prasad i sur. (35) su ispitali vezanje cinka u humanom serumu, koristeći se ultrafiltracijom i markiranjem seruma sa ^{65}Zn . *Prasad* i sur. (35) su našli da je molarni udio Zn/protein najveći za ccruloplazmin, signifikantan iznos Zn bio je vezan na albumin, transferin i IgG globulin. Oni predpostavljaju da se Zn veže na dva različita mjesta na albumin, a jedno od ta dva mjesta ima znatno veći afinitet prema Zn. Osim toga, isti autori, ispitali su vezanje cinka na amino kiseline u serumu i našli da se cink osobito veže na histidin, glutamin, treonin, cistin i lizin, pa prema tome amino kiseline mogu imati značajnu ulogu u biološkom transportu cinka.

Vikbladh (2, 3) je našao da u humanom serumu postoje dvije frakcije cinka, jedna frakcija je lagano vezana i može se ekstrahirati ditizonom u acetonu, a druga je čvrsto vezana na proteine seruma i ne može se ekstrahirati ditizonom. Oko 60% cinka u serumu je lagano vezano, a oko 40% je čvrsto vezano na proteine.

Slične rezultate je dobio i *Wolff* (8) koristeći adsorpciju cinka na aluminijev oksid. U istom radu bila je ispitana distribucija ^{65}Zn u elektroforetski odvojenim frakcijama serumskih proteina, a ispitana je i čvrstoća veze ^{65}Zn s tim frakcijama seruma pasa. Psima je peroralno dan cink-65 dobro izmiješan sa 50 ml mlijeka. Krv je uzeta nakon 3, 6, 9, 12, 18 ili 24 sati nakon početka pokusa. Preparativnom elektroforezom na papiru separirane su bjelančevine seruma kod pII 7,4 u Veronal-natrium-natrium-acetat puferu, jer su prema njihovom iskustvu kompleksi cinka s bjelančevinama u serumu stabilni samo kod fiziološkog pH. Pomicanjem pH u oba smjera ti kompleksi se u većoj mjeri disociraju.

Nakon 10–15 minuta kada je psima peroralno dan ^{65}Zn u mlijeku, dakle organski vezan, mogla se detektirati radioaktivnost u serumu. Tako uzeti ^{65}Zn rasporedio se kako na albumine tako i na globuline, a osobito na alfa₁ i alfa₂-globulinske frakcije. Na albuminima je nađeno 36% od ukupnog aktiviteta ^{65}Zn u serumu i gotovo je sav ^{65}Zn lagano vezan. Na alfa₁ je 24% a na alfa₂-globulinima je 27% od ukupnog aktiviteta ^{65}Zn i gotovo je sav čvrsto vezan. Na beta₁-globulinima se nalazilo 8% a na gama-globulinima 5% od ukupnog aktiviteta ^{65}Zn seruma.

Nakon završene resorpcije (6 sati) nalazilo se oko 30% aktiviteta ^{65}Zn u albuminima, oko 25% u alfa₁ i u alfa₂ području i oko 10% u beta₁ odnosno gama-globulinskom području. U idućih 6 sati zajednički aktivitet seruma je pao za 60%, a u frakciji albumina za gotovo 95%, dok je u ostalim frakcijama taj pad iznosio od 40–50%. To pokazuje da slabo vezani ^{65}Zn vezan pretežno u albuminskoj zoni brže nestaje nego čvrsto vezani ^{65}Zn na alfa₁ i alfa₂-globulinima. Taj slabo vezani cink

je vjerojatno transportni oblik cinka u plazmi. Nakon 9 sati od početka pokusa, autori su zapazili porast aktivnosti ^{65}Zn na beta-globulinima; međutim, u taj rezultat nisu sigurni zbog eventualnih metodičkih pogrešaka. Na žalost, 12 sati nakon pokusa mjerenje radioaktivnosti u serumu bilo je na granici mogućnosti mjerenja.

Gunn i sur. (10) su intrakardijalno dali ^{65}Zn štakorima, a zatim su elektroforetski ispitali ekskrete lateralnog, ventralnog i dorzalnog dijela prostate. Istovremeno su uzeli iz srca uzorak krvi iz koje je priređen serum. Separacija bjelančevina seruma izvršena je jednodimenzionalnom elektroforezom na papiru u toku 18 sati u veronalnom puferu pH 8,6. Radioaktivnost je bila detektirana u četiri glavne elektroforetske frakcije seruma: albuminu, alfa₁, alfa₂ i beta-globulinima. Prema grafičkom prikazu najveću aktivnost su detektirali u području albumina. Ovdje je važno reći da se maksimum aktivnosti ^{65}Zn ne poklapa s maksimumom koncentracije albumina i da najpokretljiviji dio albuminske zone nema ^{65}Zn . Pod istim elektroforetskim uvjetima ^{65}Zn apliciran kao $^{65}\text{ZnCl}_2$ bez prisutnosti proteina putovao je samo oko 2,5 cm prema anodi.

Uesell i *Bearn* (11) su uzeli 5 ml nehemoliziranog svježeg seruma i separirali jednodimenzionalnom elektroforezom na škrobnom ili polivinilskom gelu u barbituratnom puferu pH 8,6. Oni su zapravo ispitivali dehidrogenazu mliječne kiseline, za koju su znali da sadrži cink, pa su kunićevu plazmu ili humanu plazmu *in vitro* obilježili sa ^{65}Zn uspoređujući aktivnosti dehidrogenaze mliječne kiseline i radioaktivnost ^{65}Zn u separiranim frakcijama seruma. Kod obadvije vrste ispitanog seruma našli su dvije radioaktivne zone. U humanom serumu je veća aktivnost ^{65}Zn bila u malo pokretnom dijelu albumina, a manji dio ^{65}Zn je migrirao u zonu alfa₂-globulina na mjestu gdje se nalazi alfa₂ aktivnost mliječne dehidrogenaze seruma.

Slične rezultate pretežnog vezanja ^{65}Zn na alfa-globuline objavili su *Dennes* i sur. (12). Humanu plazmu su obilježili sa ^{65}Zn ravnotežnom dijalizom. Tako obilježenu plazmu podvrgli su Cohnovoj nisko-temperaturnoj tehnici frakcioniranja i dobili ove frakcije: fibrinogen, beta i gama-globulin (plus protrombin i plazminogen), alfa i beta-globuline s nešto albumina i albumin. U svakoj frakciji su mjerili koncentraciju dušika i aktivnost ^{65}Zn . Rezultate su izrazili kao odnos (^{65}Zn u frakciji/mg dušika)/(^{65}Zn u plazmi/mg dušika). Jedino je frakcija koja se sastojala od alfa i beta-globulina imala taj odnos veći od jedinice (1,53–2,74). Najmanji odnos je bio na albuminskoj frakciji.

Za ta ispitivanja koristili su još i jednodimenzionalnu elektroforezu na papiru i škrobnom gelu u veronalnom puferu pH 8,6. Budući da su *in vivo* i *in vitro* pokusima koristili cink-glicin otopinu, ispitali su utjecaj glicina na migraciju cinka u tom puferu. Oni su pokazali da ^{65}Zn pod tim elektroforetskim uvjetima putuje prema katodi oko 3 cm, bez obzira da li je apliciran na traku kao $^{65}\text{ZnCl}_2$ ili kao ^{65}Zn -glicin otopina (^{65}Zn -glicin otopina je priređena ovako: 20 mg glicina u jednom ml vode

dodano je otopini $ZnCl_2$ koja je sadržavala ^{65}Zn , zatim je $NaOH$ dodavan da se podesi pH otopine na 7,4. Ovoj otopini je još dodano 4,5 ml vode i 42 mg $NaCl$.

člaman serum (2 ml) obilježen je in vitro s tom ^{65}Zn -glicin otopinom (0,5 ml) i nakon 5 minuta mješanja uzorak je separiran jednodimenzionalnom elektroforezom na papiru. Albumini su sadržavali 22–38%, alfa1-globulini 25–34%, alfa2-globulini 25–26%, beta globulini 17% i gama globulini 1% od totalnog cinka-65 u plazmi. Kad su autori izrazili ove rezultate kao odnos (^{65}Zn u proteinskoj frakciji/mg dusika)/(^{65}Zn u ukupnoj plazmi/mg dusika), dobili su ove odgovarajuće vrijednosti: za albumin 0,4–0,6; za alfa1 3,6–4,0; za alfa2 3,0–3,5; za beta 1,2–1,3 i za gama-globuline 0,1.

U pokusu sa kuničevom plazmom našli su da je 44–54% od ukupnog ^{65}Zn u plazmi na albuminima, 38–44% na alfa1 i alfa2-globulinima i 8% na beta odnosno 1% na gama-globulinima.

Jedan sat ili tri sata nakon intravenozne injekcije iste ^{65}Zn -glicin otopine, koja je služila i za in vitro obilježavanje plazme, ispitana je jednodimenzionalnom elektroforezom na papiru in vivo obilježena plazma štakora. Treba naglasiti da su rezultati iz uzoraka iste plazme bili prilično različiti osobito u beta-globulinskoj frakciji. Nije navedeno zbog čega je radioaktivnost u alfa1 i alfa2-globulinima zbrojena, a izričito je rečeno da je sadržaj ^{65}Zn u alfa1 i alfa2-globulinima bio podjednak. Prema njihovim rezultatima čini se da gama-globulini nemaju značajne uloge u vezanju plazmatskog cinka, jer se u toj frakciji nalazi vrlo mala aktivnost, bez obzira da li su uzeti u ispitivanje serum ili plazma obilježena in vitro, ili plazma obilježena in vivo. Najveći dio aktivnosti ^{65}Zn od 47–48% su našli u alfa-globulinima, 5 minuta i 1 sat nakon injekcije izotopa. Albuminska frakcija je sadržavala od 20–56% dok su beta-globulini imali raspon čak 1–18% od ukupne radioaktivnosti u plazmi.

Da bi utvrdili da distribucija ^{65}Zn određena s elektroforezom na papiru nije uvjetovana eksperimentalnim uvjetima, isti autori su napravili nekoliko elektroforetskih separacija u škrobnom gelu, a da nisu objasnili zašto su upravo od te metode očekivali potvrdu rezultata dobivenih jednodimenzionalnom elektroforezom na papiru. Nekoliko uzoraka kuničeve plazme koji su dobiveni 5 minuta nakon injekcije ^{65}Zn separirali su jednodimenzionalnom elektroforezom na škrobnom gelu, pa su dobili ove vrijednosti: alfa2-globulini 48%, albumini 36%, beta-globulini 14% od ukupne radioaktivnosti u plazmi. Jedan sat nakon injekcije ^{65}Zn alfa2-globulini sadrže 57%, albumini 12% a beta-globulini 26%. Rezultati su izraženi kao postotak od ukupnog ^{65}Zn na traci škrobnog gela. Gama-globulini su imali vrlo malu radioaktivnost od 1% ili još manje.

Očita kontradikcija u do tada objavljenoj literaturi navela je *Okunewicka* i sur. (1) da ponovno ispituju distribuciju lagano vezanog ^{65}Zn u cirkulirajućoj plazmi. Pozivajući se na radove *Vikbladha* (3), *Wolffa* (7) i *Gunna* (10) oni zaključuju da je lagano vezani ^{65}Zn u cirkulirajućoj

plazmi raspoređen između albumina i globulina u gotovo paralelnom omjeru u kojem su zastupljene i relativne koncentracije odnosnih proteina. U suprotnosti s tim, navode rezultate *Vesella* i *Bearna* (11) kao i *Dennesa* i sur. (12) prema kojima je (kako je to već opisano u ovom pregledu) ^{65}Zn pretežno vezan u alfa-globulinskom području.

U istom laboratoriju su *Okunewick* i sur. (36) 1962. prvi put pokazali da je u vremenu od jednog sata nakon intravenozne injekcije $^{65}\text{ZnCl}_2$ štakorima, sav ^{65}Zn u obliku lagano vezanog cinka vezan na proteine plazme. To je bio razlog da su u idućem radu (1) odabrali štakora kao pokusnu životinju. U tom pomno izvedenom radu *Okunewicka* i sur. korištena je ultracentrifuga i jednodimenzionalna elektroforeza na papiru kao analitičke metode da se ponovo ispita distribucija ^{65}Zn u plazmi štakora.

Nakon injekcije $^{65}\text{ZnCl}_2$ u cirkulirajuću plazmu, u određeno vrijeme žrtvovano je po 4 štakora, a plazma je odvojena laganim centrifugiranjem. Tako dobivene plazme su pomiješane, stavljene u preparativnu ultracentrifugu na 70.000 g i ultracentrifugirane 8 sati. Jedino je za nultu vrijeme napravljena iznimka od obilježavanja plazme in vivo. U nultom vremenu radiocink je direktno stavljen u plazmu, pomiješan i in vitro inkubiran jedan sat na 37°C . Ultracentrifugom su dobivene četiri frakcije plazme. Analiza frakcije na proteine izvršena je jednodimenzionalnom elektroforezom na papiru u veronalnom puferu pH 8,6. Radioaktivnost frakcija dobivenih ultracentrifugom mjerena je scintilacionim brojačem. Aktivnost ^{65}Zn je gotovo točno slijedila iznos bjelančevina u tim frakcijama. Nije zapažena razlika između in vivo i in vitro obilježene plazme.

Budući da radioaktivnost slijedi koncentraciju bjelančevina, oni su zaključili da ni jedna bjelančevina u frakcijama plazme nema izrazitog afiniteta za vezanje ^{65}Zn , barem ne u toku prvog sata nakon injekcije radioaktivnog cinka. Isti autori su još ispitali utjecaj intrakardijalno injiciranog albumina, alfa-globulina ili gama-globulina obilježenih in vitro sa ^{65}Zn , na izlučivanje cinka. Obilježavanje plazme je izvršeno inkubiranjem 4 sata na 37°C kod pH 6,9 u »Tyrode« otopini, a zatim je iniciran ^{65}Zn -protein ili obilježena plazma, nije bilo razlike u količini ^{65}Zn u cirkulirajućoj plazmi. To je protumačeno da ni jedna od injiciranih frakcija nije imala veći afinitet prema ^{65}Zn od plazme.

Budući da su željeli riješiti kako je došlo do postulirane lokalizacije radioaktivnog cinka u alfa globulinskoj regiji *Okunewick* i sur. su in vitro obilježili pročišćen albumin i gama-globulin sa ^{65}Zn . Dvije jednodimenzionalne elektroforetske separacije na trakama filter papira napravljene su kod pH 8,6 u veronalnom puferu. Prva separacija je trajala samo 4 sata, a druga 16 sati. Poslije 4 sata 23,5% izotopa se nalazilo u albuminskoj regiji, 8,6% u gama-globulinskoj regiji, a 68,3% u području gdje nije bilo proteina. Nakon 16 sati odgovarajuće vrijednosti su bile 3,1%, 13,8% i 83,1%. Takvo ponašanje ^{65}Zn za vrijeme elektroforeze oni tumače mogućnošću otpuštanja ^{65}Zn za vrijeme elek-

troforeze. U prilog toj interpretaciji navode rad *Gurda* i *Goodmana* (9) u kojem je opisano da vezanje cinka na albumine ovisi o pH. *Uesell* je u osobnom saopćenju autorima (1) naveo da je našao kako in vitro vezanje cinka ovisi o pH, i da je maksimum vezanja oko pH 7,4 a da se kod pH 8,6 oko 16% cinka može dijalizirati. *Okunewick* i sur. smatraju da su iza albumina ostali slobodni ioni cinka i to u formi u kojoj bi normalno trebali putovati u suprotnom smjeru od albumina.

Racoveanu i sur. (37) su kunićima intraperitonealno davali $^{65}\text{ZnCl}_2$. Dva sata kasnije uzimani su uzorci krvi i jetre, punkcijom srca odnosno jetre. Za ^{65}Zn su našli da je vezan na proteine seruma u takvoj formi da se ne može dijalizirati kod pH 8,6 kroz celofansku membranu, prema TRIS-fosfatnom puferu. Frakcioniranje bjelančevina su izvršili na DEAE celulozi u pH i molarnom gradijentu TRIS-fosfatnog pufera. Eluatima je određena radioaktivnost, a zatim spektrofotometrijski sadržaj proteina na 280 $m\mu$ i sadržaj cinka na 328 $m\mu$. Najaktivnije frakcije efluenta dijalizirane su prema destiliranoj vodi, liofilizirane i elektroforetski komparirane s punim serumom. Za ta ispitivanja korištena je jednodimenzionalna elektroforeza na papiru i agar-gelu. Najaktivnije liofilizirane frakcije pokazale su sličnu distribuciju ^{65}Zn kao i injicirani serum. Analize efluenta su pokazale da neke frakcije imaju određenu tendenciju vezanja ^{65}Zn . Isti fenomen je zapažen spektrofotometrijskim mjerenjem cinka u istim uzorcima efluenta. Frakcija s maksimalnom radioaktivnosti bila je alfa₂-globulin dok je radioaktivnost nađena još i na albuminima i alfa₁-globulinima. *Racoveanu* i sur. (37) su elektroforetski našli da je oko 80% aktiviteta ^{65}Zn distribuirano podjednako između alfa₁-globulina i albumina i da je ostatak na alfa-globulinima, dok beta- i gama-globulini praktički nisu sadržavali radioaktivnost. Na osnovi elektroforetskih separacija proteina izračunata je specifična aktivnost svake proteinske frakcije. Za jedinicu je odabran albumin, a prema tome su alfa₁-globulini sadržavali 7,4 puta veću specifičnu aktivnost od albumina, odnosno pet puta veću od alfa₂-globulina.

Fritze i *Geitz* (38) su ispitivali in vitro kontaminiran serum s mikrogramskim količinama ^{65}Zn , ^{63}Cu i s još nekim metalima. Tako kontaminirane uzorke seruma su frakcionirali gel filtracijom sa 0,15 M amonijevim acetatom na kromatografskoj koloni Bio-gel-150. Tom kromatografskom tehnikom se dobiju tri glavne frakcije proteina seruma. Prva frakcija sadržati beta_{2M} (19S γ -) i alfa_{2M}-globuline, alfa i beta lipoproteine, druga frakcija 7 S gama-globulin, a treća albumin.

Za ^{65}Zn je nađeno da se nalazi u efluentu sa ^{64}Cu i ^{72}Ga i to u albuminskoj frakciji. Na osnovi simetričnog rasporeda cinka u efluentu albuminske frakcije *Fritze* i *Geitz* zaključuju da se radi o metal-proteinskom kompleksu.

Ljevačka ili cinkova groznica

Otrovanja cinkom mogu biti posljedica uzimanja toksičnih količina cinka hranom ili pićem, direktnog kontakta kože cinkovim solima i inhalacije velikih koncentracija svježih para cinkovog oksida.

Dodatak toksične količine cinka hrani izaziva akutnu i prolaznu bolest nakon nekoliko minuta poslije uzimanja. Simptomi su slabost, vrtoglavica, kolitis i proljev. Prekomjerno uzimanje cinka hranom često se može pripisati pripravi kiselih živežnih namirnica (voće, sokovi) a posljedica je velike topivosti cinka u njima (39).

Općenito je ljudska koža tolerantna prema cinku, međutim, izlaganje kože cinkovim solima, cink kloridu, cink fosfatu ili cink kromatu može imati za posljedicu oštećenje kože.

Ljevačku ili metalnu groznicu može uzrokovati niz metala, a najčešće cink, bakar i magnezij. Uz te se metale spominju aluminij, antimon, nikal, kadmij, kositar, mangan, selen, srebro pa i željezo (49).

Budući da se cink tali na mnogo nižoj temperaturi (419^o C) nego bakar, to se cinkova para i dim počnu stvarati prije nego se bakar počne taliti. To je razlog zbog čega se ovo oboljenje najčešće naziva cinkova groznica. Simptomi cinkove groznice su tresavica, bolovi u zglobovima, mučnina, glavobolja, katkada žeđ, povišena temperatura, suhoća u grlu, kašalj, opća slabost i umor.

Među laboratorijskim nalazima karakterističan je povišen broj leukocita (12.000–16.000 mm³), a među bijelim krvnim zrnima se ističe broj cozinofilnih leukocita. Takvo stanje redovito traje 24 do 48 sati, nakon čega dolazi do potpunog ozdravljenja.

Mehanizam nastanka cinkove groznice nije ni do danas uspjelo potpuno objasniti (40).

Proučavanja u SAD prije nešto više od 40 godina (40) pokušala su protumačiti zašto se ljevačka groznica pojavljuje kod radnika izloženih parama netom stvorenog cinkovog oksida, a ne pojavljuje se nikada kod radnika izloženih prašini cinkovog oksida, mada se taj potonji inhalira u mnogo većoj koncentraciji nego isti spoj nastao kod lijevanja cinka. Cinkov oksid u prahu se sastoji od čestica koje su se međusobom spojile pa su postale veće i teže i zbog toga lakše prijanjaju uz stijenku neke cijevi, dok su čestice nastale oksidacijom vaporiziranog cinka suhe i sitno dispergirane pa kad prolaze kroz cijev ne prijanjaju uz nju čak ni onda kad je cijev jako svinuta. Dakle pod optimalnim uvjetima cinkov oksid »in statu nascendi«, može kroz nos ili usta dospjeti u dušnik i ne zaustavljajući se, dalje niz bronhe, doprijeti do krvne struje. Tako dospjele čestice metalnog oksida vjerojatno su vezane na neku bjelančevinu, koja se zbog te veze toliko izmijenila da djeluje kao tijelu strana bjelančevina. To potkrepljuju simptomi metalne groznice, koji se ne razlikuju od simptoma što ih izazove injekcija mlijeka ili neke druge strane bjelančevine.

Osim radova *Drinkera* podaci o cinkovoj groznici u literaturi su vrlo oskudni. Nakon već spomenutog rada *Dimova* (41) na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada, 1969. godine je objavljen i rad *Hamdija* (42).

Rezultati koje su dobili ta dva autora se uglavnom poklapaju što se tiče anamnestičkih podataka. U laboratorijskim nalazima treba istaknuti da je u radu *Dimova* primijećen relativni porast cinka u serumu nakon ekspozicije. *Hamdi* je pak našao signifikantan porast cinka u krvnim tjelešcima, ukupnoj krvi i u želučanom soku kod radnika kronično ekspoziranih parama cinka.

Pokušaj tumačenja nastanka cinkove, odnosno metalne groznice, nalazimo kod *Letaveta* i suradnika (43). Prema njihovu mišljenju najsitnije čestice cinkovog oksida raspoložu s izvanredno velikom kinetičkom energijom i električnim nabojem, pa zbog te velike fizikalno-kemijske aktivnosti lako izazivaju deskvamaciju stanica sluznice bronha i alveolarnog epitela, izazivaju denaturaciju bjelanjčevina, koje onda kroz stijenke alveola prodiru u krvotok, gdje djeluju pirogeno kao strane bjelanjčevine.

Znatno kasnije, 1960. godine, *McCord* (44) primjenom imunoloških saznanja i analogijom pokušava razjasniti mehanizam nastanka cinkove odnosno metalne groznice. Autor pretpostavlja ovakav redoslijed mogućih procesa kod nastajanja metalne groznice:

1. Netom stvoreni metalni oksidi su jako aktivni i lakše oštećuju tkiva, nego već sasvim formirani oksidi.
2. Kad ovi oksidi dospiju u dišne putove djeluju nadražujuće i izazivaju upalu.
3. U tom procesu oslobađa se histamin ili histaminu srodne tvari i njihovo djelovanje dovodi do početnog stanja koje može biti »histaminski šok«.
4. Oštećeno respiratorno tkivo, stvarajući hipotetski metalni proteinat, stvara alergen i dovodi do stvaranja kompleksa antigen-antitijelo, što opet dovodi do alergijske reakcije u idućoj ekspoziciji.
5. Budući da je taj kompleks antigen-antitijelo (A) tijelu strana tvar, dolazi do stvaranja antitijela (B).
6. Dolazi do sukoba djelovanja antitijela (A) i (B).
7. Prisutnost ili djelovanje antitijela (B) je kraćeg trajanja nego antitijela (B), i zahtijeva kontinuirano obnavljanje, a to se događa kontinuiranim izlaganjem parama metala.
8. Kad nema trajne ekspozicije metalnim parama dominira kompleks alergen-antitijelo (A) i nastaje alergijska bolest.
9. Kad postoji trajno izlaganje dominira antitijelo (B) tako da bolest ne nastaje.
10. Kod pretjerane ekspozicije zaštitni mehanizam nije dostatan i prevladava bolest.

Niti jedna od tih postavki nije dokazana, nego se možda mogu samo prema analogiji prihvatiti.

Posve novim pristupom u rješavanju problema mehanizma nastanka cinkove groznice bavi se jedan od nas (Štilinović) u svojem radu (13, 14). Može se, naime, poći od pretpostavke da bez obzira na mehanizam nastanka cinkove groznice, vjerojatno u serumu ljudi eksponiranih parama cinka postoji ta hipotetska sa cinkom izmjenjena bjelančevina. Ako je tome tako, onda se pogodnom metodom frakcioniranja serumskih bjelančevina ona daje i izolirati. Isti autor je našao da su elektrokromatografija i kontinuirana elektroforetska separacija bjelančevina, kombinirana s tehnikom radioaktivnog markiranja serumskih bjelančevina izvanredno pogodne metode za takva ispitivanja. Upravo je takvom tehnikom ispitana distribucija ^{65}Zn u serumskim proteinima, normalnog humanog seruma, ispitanika koji nisu bili eksponirani parama cinka (45, 46). Kasnije je istom tehnikom ispitana distribucija ^{65}Zn u serumskim bjelančevinama ispitanika koji su profesionalno bili izloženi parama cinka (13). U oba ispitivanja obilježavanje seruma sa ^{65}Zn bilo je *in vitro*. Nije bilo razlike u distribuciji ^{65}Zn u serumskim proteinima koja se mogla očekivati zbog eventualne prisutnosti hipotetskog Zn-proteinata. Valja naglasiti da u tim pokusima nije bilo niti jednog seruma ispitanika koji bi bio u akutnoj fazi cinkove groznice.

ZAKLJUČAK

Biološko značenje cinka, kao oligo elementa, sve se intenzivnije istražuje. Danas se koncentracija cinka u serumu ili plazmi koristi u diferencijalno dijagnostičke svrhe. Pa ipak nije ni izdaleka razjašnjeno fizikalno-kemijsko stanje cinka u serumu ili plazmi, kao ni transportni oblik cinka u tijelu, makar se tim problemom već cijeli niz godina bavi više različitih grupa istraživača. U literaturi postoje podaci o distribuciji cinka u serumskim proteinima, ali su očite razlike u navedenim rezultatima. Te razlike treba pripisati primijenjenoj tehnici istraživanja kako je to već bilo pokazano (45). U sklopu opće problematike interakcije cinka sa serumskim proteinima, javlja se i problem nastanka cinkove groznice. Uvid u fizikalno-kemijsko stanje metala i interakciju metal-protein, možemo dobiti upotrebom radio aktivnog metala i korištenjem jedne od elektroforetskih tehnika, elektrokromatografije ili kontinuirane elektroforeze.

I unatoč tomu što je primjenjena tako rafinirana tehnika za eventualno otkrivanje hipotetskog Zn-proteinata, za sada mehanizam nastanka cinkove groznice još uvijek ostaje u domeni spekulacije.

Literatura

1. Okunewick, J. P., Schjeide, O. A., Carlsen, E. N., Hennessy, T. G.: Distribution of Radiozinc in Rat Plasma, *Nature*, 198 (1963) 966.
2. Vikbladh, L.: Studies on Zinc in Blood, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 2 (1950) 143.
3. Vikbladh, L.: Studies on Zinc in Blood II, *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.*, 2, 1951.
4. Wolff, H. P.: Pathophysiologie und Klinik des Zinkstoffwechsels, *Verh. dtsh. Ges. inn. Med.* 70. Kongr. (1964).
5. Wolff, H. P.: Der normale Zinkgehalt in Blut, Serum und Erythrocyten, *Deutsch. Arch. klin. Med.*, 197 (1950) 263.
6. Wolff, H. P.: Untersuchungen über die Bestimmung von Zink mit Dithizon in biologischen Präparaten, *Biochem. Z.*, 325 (1954) 267.
7. Wolf, H. P.: Untersuchungen zur Pathophysiologie des Zinkstoffwechsels, *Klin. Wschr.*, 34 (1956) 409.
8. Wolff, H. P., Schmidt, J. G. H., Althaus, G., Knedel, M.: Untersuchungen über die Bindung des Zinks an Serumweißkörper, *Z. ges. exp. Med.* 127 (1956) 362.
9. Gurd, F. R. N., Goodman, S.: Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. XXXII. The Interaction of Human Serum Albumin with Zinc Ions, *J. Amer. Chem. Soc.*, 74 (1952) 670.
10. Gunn, A. S., Gould, T. C., Anderson, W. A. D.: Comparison of Protein and Zinc Electrophoretic Patterns of Lobes of Rat Prostate, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 110 (1962) 32.
11. Uesell, E. S., Bearn, A. G.: Localization of Lactic Acid Dehydrogenase Activity in Serum Fractions, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 94 (1957) 96.
12. Deemes, E., Tupper, R., Wormald, A.: Studies on Zinc in Blood. Transport of Zinc and Incorporation of Zinc in Leucocytes, *Biochem. J.*, 82 (1962) 466.
13. Stilinović, L.: ⁶⁵Zn in Serum Proteins in Persons Exposed to Zinc. Investigation in Vitro, *Arh. hig. rada*, 21 (1970) 23.
14. Stilinović, L.: ⁶⁵Zn in Serum Proteins of Persons Exposed to Zinc. Investigation in Vitro, Coordination Conference on Toxicological Hygiene, Budimpešta 1969. Zbornik, poseban otisak.
15. Nikolić, B.: *Biohemija*, Naučna knjiga, Beograd, 1963, str. 187.
16. Raulin, J.: Etudes cliniques sur la végétation, *Ann. Sci., Nat. Botan. et Biol. Vegetale*, 11 (1869) 93. u: Vallée, L. B.: *Biochemistry, Physiology and Pathology of Zinc*, *Physiological Reviews*, 39 (1959) 443.
17. Lutz, R. E.: The Normal Occurrence of Zinc in Biologic Materials, *J. Ind. Hyg.*, 8 (1926) 177.
18. Sheline, G. E., Chaikoff, I. L., Jones, H. B., Montgomery, M. L.: Distribution of Administered Radioactive Zinc in Tissues of Mice and Dogs, *J. Biol. Chem.*, 149 (1943) 139.
19. Sheline, G. E., Chaikoff, I. L., Jones, H. B., Montgomery, M. L.: Excretion of Administered Zinc in Urine and Feces, *J. Biol. Chem.*, 147 (1943) 409.
20. Prasad, A. S., Miale, A., Farid, Z., Sanstead, H. H., Schulert, A. R.: Zinc Metabolism in Patients with Syndrome of Iron Deficiency Anemia, Hepatosplenomegaly, Dwarfism, and Hypogonadism, *J. Lab. Clin. Med.*, 61 (1963) 537.
21. Vallee, B. L.: *Biochemistry, Physiology of Zinc*, *Physiol. Rev.*, 39 (1959) 443.
22. Vallee, B. L.: Metabolic Role of Zinc, *J. Am. Med. Assoc.*, 162 (1965) 1053.
23. Prasad, A.: Trace Elements in Nutrition. Nutritional Metabolic role of Zinc, *Federation Proc.*, 26 (1967) 172.
24. Keilin, D., Mann, T.: Carbonic Anhydrase. Purification and Nature of the Enzyme, *Biochem. J.*, 34 (1940) 1163.

25. Halsted, A. J., Smith, J. C.: Plasma-Zinc in Health and Disease, *Lancet*, 14 (1970) 322.
26. Gurd, F. R., Wilcox, P. E.: Complex Formation between Metallic Cations and Proteins, Peptides, and Amino Acids, *Advances in Protein Chem.*, 11 (1956) 311.
27. Olson, A. D., Hamlin, W. B.: Serum Copper and Zinc by Atomic Absorption Spectrophotometry, *Atomic Absorp. News Letter*, 7 (1968) 69.
28. Stojanovski, A.: Upoređenje vrijednosti cinka u serumu dobivenih pomoću dvije različite kemijske metode, Specijalistički rad, Zagreb, 1968.
29. Kahn, A. M., Helwig, H. L., Redeker, A. G., Reynolds, T. B.: Urine and Serum Abnormalities in Diseases of the Liver, *Am. J. Clin. Path.*, 44 (1965) 426.
30. Spencer, H., Rosoff, B., Feldstein, A., Cohn, H. S., Gusmano, E.: Metabolism of ^{65}Zn in Man, *Radiation Res.*, 24 (1965) 432.
31. Kallai, L., Keler-Bačoka, M., Marinković, M., Knežević, S., Stojanovski, A., Koršić, Z.: Zinkwerte im Serum bei Leberkrankheiten, *Schweiz. med. Wschr.*, 98 (1968) 1007.
32. Kallai, L., Keler-Bačoka, M., Stojanovski-Buban, A., Koršić, M., Knežević, S., Hadžić, N.: Zinkwerte in Leber und Harn bei Leberzirrhose, *Schweiz. med. Wschr.*, 101 (1971) 643.
33. Himmelhoch, S. R., Sober, H. A., Valle, B. L., Peterson, E. A., Fuwa, K.: Spectrographic and Chromatographic Resolution of Metallproteins in Human Serum, *Biochem.*, 5 (1966) 2523.
34. Parisi, F. A., Vallee, B. L.: Isolation of a Zinc-Containing alpha-Macroglobulin from Human Serum, *Lancet*, 14 (1970) 1222.
35. Prasad, A. S., Oberleas, D.: Zinc in Human Serum: Evidence for an Amino Acid-Bound Fraction, *J. Clin. Invest.*, 48 (1969) 66a.
36. Okunewick, J. P., Pond, B., Hennessy, T. G.: Behavior of Radiozinc in Rat Plasma, *Am. J. Physiol.*, 202 (1962) 926.
37. Racoveanu, N., Stanculescu, U., Stoica, G., Ciubataru-Bordeianu, A.: ^{65}Zn and ^{59}Fe -Binding Proteins in Guinea-Pig Serum, *Radioecological Concentration Processes, Proceedings of International Symposium held in Stockholm, 25-29, April, 1966*, Pergamon Press-Oxford-New York, 1966.
38. Fritze, K., Geitz, R. J.: Contamination Problems in the Trace Analysis for Protein Bound Metals, *J. Radioanal. Chem.*, 1 (1968) 265.
39. Johnson, C. O.: Zinc Poisoning From Contaminated Foods, Questions and Answers, *JAMA*, 188 (1964) 838.
40. Sarić, M., Majić-Prpić, D., Beritić, T.: Patologija rada, Panorama, Zagreb, 1965, str. 119.
41. Dimov, D.: Laboratorische Parameter bei intermittenter Zinkdampfexposition, *Coordination Conference on Toxicological Hygiene, Budimpešta 1969, Zbornik, poseban otisak*.
42. Hamdi, A. E.: Chronic Exposure to Zinc of Furnace Operators in a Brass Foundry, *Brit. J. Industr. Med.*, 26 (1969) 126.
43. Izraelson, Z. I., Kaplun, S. I., Letavet, A. A., Pik, C. D., Smeljanski, Z. B.: Higijena rada, Medicinska Knjiga, Zagreb, 1949, str. 238.
44. McCord, C. P.: Metal Fume Fever As an Immunological Disease, *Industr. Med. Surg.*, 29 (1960) 101.
45. Štilinović, L.: Vežanje ^{65}Zn na serumske bjelančevine in vitro, Magistarski rad, Sveučilište u Zagrebu, 1970.
46. Štilinović, L., Pučar, Z.: Dvodimenzionalna elektrokromatografija humanog seruma opterećenog sa ^{65}Zn in vitro. Sastanak kemičara Hrvatske 1969 i I jugoslavenski simpozij o kemiji i tehnologiji makromolekula, Zagreb 1969, Sinopsisi, B-2/39.

Summary

METAL FUME FEVER, ZINC AND SERUM PROTEINS

A review of biologic significance of zinc is given. Particular attention is paid to the investigations of its physico-chemical state and interactions of zinc with serum proteins. Metal fume fever and zinc fever is described in details and in the light of recent experimental works and hypotheses on the mechanism of its occurrence.

*Institute for Medical Research and
Occupational Health, Yugoslav Academy
of Arts and Sciences, Zagreb*

*Received for publication
December 15, 1970*